

**GENES ENCODING PROTEINS HAVING ACTIVITY OF TRANSFERRING SUGAR ONTO AURONE****Publication number:** WO0049155**Publication date:** 2000-08-24**Inventor:** SAKAKIBARA KEIKO (JP); FUKUI YUKO (JP); TANAKA YOSHIKAZU (JP); KUSUMI TAKAAKI (JP); YOSHIKAWA TAKAFUMI (JP)**Applicant:** SUNTORY LTD (JP); SAKAKIBARA KEIKO (JP); FUKUI YUKO (JP); TANAKA YOSHIKAZU (JP); KUSUMI TAKAAKI (JP); YOSHIKAWA TAKAFUMI (JP)**Classification:****- International:** C12N1/21; C12N9/10; C12N15/54; C12N15/82; C12P19/60; C12N1/21; C12N9/10; C12N15/54; C12N15/82; C12P19/00; (IPC1-7): C12N15/54; A01H5/00; C12N1/21; C12N9/10; C12P19/18; C12N1/21; C12R1/19**- european:** C12N9/10D; C12N9/10D1; C12N15/82C4B; C12N15/82C4B8; C12P19/60**Application number:** WO2000JP00876 20000216**Priority number(s):** JP19990036801 19990216**Also published as:**

EP1072684 (A1)

US6770747 (B1)

CA2325385 (A1)

**Cited documents:**

WO9905287

XP002924338

XP002924339

**Report a data error here****Abstract of WO0049155**

Genes which encode proteins originating in, for example, petunia or antirrhinum and having the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 2, 8 and 10; a method for expressing the proteins by using these genes, etc. By transferring such a gene into a plant free from this gene, a yellow pigment aurone can be stabilized and thus a plant with yellow flowers can be obtained.

---

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 C12N 15/54, 1/21, 9/10, A01H 5/00, C12P 19/18 // (C12N 1/21, C12R 1:19)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/49155</p> <p>(43) 国際公開日 2000年8月24日(24.08.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/00876</p> <p>(22) 国際出願日 2000年2月16日(16.02.00)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平11/36801 1999年2月16日(16.02.99) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) サントリー株式会社(SUNTORY LIMITED)[JP/JP] 〒530-8203 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 榊原圭子(SAKAKIBARA, Keiko)[JP/JP] 〒617-0002 京都府向日市寺戸町西田中瀬3-1-327 Kyoto, (JP) 福井祐子(FUKUI, Yuko)[JP/JP] 〒617-0002 大阪府三島郡島本町水無瀬2-8-2-907 Osaka, (JP) 田中良和(TANAKA, Yoshikazu)[JP/JP] 〒520-0246 滋賀県大津市仰木の里2-7-4 Shiga, (JP) 久住高章(KUSUMI, Takaaki)[JP/JP] 〒564-0073 大阪府吹田市山手町2-12-21-402 Osaka, (JP) 吉川孝文(YOSHIKAWA, Takafumi)[JP/JP] 〒253-0024 神奈川県茅ヶ崎市平和町6-31 Kanagawa, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.) 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, JP, NZ, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: GENES ENCODING PROTEINS HAVING ACTIVITY OF TRANSFERRING SUGAR ONTO AURONE</p> <p>(54)発明の名称 オーロンに糖を転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子</p> <p>(57) Abstract Genes which encode proteins originating in, for example, petunia or antirrhinum and having the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 2, 8 and 10; a method for expressing the proteins by using these genes, etc. By transferring such a gene into a plant free from this gene, a yellow pigment aurone can be stabilized and thus a plant with yellow flowers can be obtained.</p>		

(57)要約

例えば金魚草、ペチュニアなど由来の、糖をオーロンに転移する活性を有する蛋白質であって、配列番号：2、8又は10に記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする遺伝子、この遺伝子を用いて前記蛋白質を発現させる方法等を提供する。この遺伝子を、該遺伝子を有しない植物に導入することにより、黄色色素オーロンを安定化させ、黄色を有する花をつける植物が得られる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	MA	モロッコ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MC	モナコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	ML	マリ	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	MR	モーリタニア	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MX	メキシコ	US	米国
CH	スイス	IE	アイルランド	MZ	モザンビーク	UZ	ウズベキスタン
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CM	カメルーン	IN	インド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラヴィア
CN	中国	IS	アイスランド	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CU	キューバ	JP	日本	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KE	ケニア	RO	ルーマニア		
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン				
DE	ドイツ	KP	北朝鮮				
DK	デンマーク	KR	韓国				

## 明 細 書

オーロンに糖を転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子

## 発明分野

本発明は、オーロンに糖を転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子、蛋白質及びその利用方法に関するものである。

## 背景技術

花色は主にフラボノイド、カロテノイド、ベタレインの3種の色素に基づいている。黄色は、主にカロテノイド及びベタレインに由来することが多いが、一部の植物の黄色はフラボノイドに由来する。フラボノイド色素の中で黄色花の発現に関係すると考えられる主な色素は、カルコン類、オーロン類、黄色フラボノール類の3つのグループに分けられる（斎藤、バイオホルティ1、p49-57、1990）。

オーロンは、2つのフェニル基がジヒドロフランの3つの炭素原子を介して結合している物質であり、オーロンとしては、4,6,4'-トリヒドロキシオーロン、オーレウシジン、スルフレチン、ブラックテアチン等が知られている。例えば、金魚草には、オーレウシジンとブラックテアチンが、スターチスにはオーレウシジンが、アサガオにはオーレウシジンが、ダリアにはスルフレチンが、ムギワラギクにはブラックテアチンが、キクイモにはスルフレチンが含まれている。

一般にフラボノイドはアシル化、配糖化、メチル化などの修飾を受けており、カロテノイド、ベタレインも配糖化されていることが多い。さまざまな修飾のうちでも配糖化は、1) 色素の安定性と溶

解性の増大への寄与、2) 色調に大きな影響を及ぼすアシル化のための前段階としての存在、3) 配糖化されたフラボノイドによるコピグメント効果など花色にとって重要な役割を担っている。

— 金魚草では、フラボノイドの1種である黄色色素オーロン（オーレウシジン、ブラックテアチン）はフラボノイドの7位に対応するその6位を配糖化された形で存在していることが報告されており、また他のオーロンを含む植物でもオーロンは配糖体として存在することから、配糖化はオーロンが安定して存在するために必要であると考えられる。

フラボノイドへの糖転移酵素遺伝子および酵素活性はさまざまな植物由来のものについて報告がなされている。

例えば、フラボノイドの3位に糖を転移するUDP-グルコース：フラボノイド3-グルコシルトランスフェラーゼ（3GT）をコードする遺伝子は、トウモロコシ、大麦、金魚草をはじめとして多くの植物から得られており、詳細に解析されている（The Flavonoids: Advanced in research since 1986. Published by Chapman & Hall, 1993）。

また、フラボノイドの5位に糖を転移するUDP-グルコース：フラボノイド5-グルコシルトランスフェラーゼ（5GT）をコードする遺伝子は、シソ、トレニア及びバーベナからクローニングされている（国際公開番号；W099/05287）。

しかしながら、フラボノイドの7位に糖を転移するUDP-グルコース：フラボノイド7-グルコシルトランスフェラーゼ（7GT）をコードする遺伝子は、グレープフルーツでフラバノン特異的7-グルコシルトランスフェラーゼの精製の報告があるのみである（Archives of biochemistry and biophysics 282, 1, 1990, 50-57）。

オーロンの6位に糖を転移する酵素について、キク科植物のクレ

オブシス・グラディフロラ (*Creopsis grandiflora*) で、オーロンの一種であるスルフレチンの 6 位に糖を転移する反応を測定した例はある (Plant science 122, 1997, 125-131) が、部分精製標品を用いて酵素学的性質を調べたとどまっており、純粋な形まで精製された報告はない。

一方、シソ科植物コガネバナの毛状根からフラボンの 1 種である、バicalein (baicalein) の 7 位にグルコースを転移する活性を持つ糖転移酵素遺伝子・pS. b UFGT1 が単離されたとの報告がある (1997 年、第 15 回日本植物細胞分子生物学会発表)。この遺伝子産物は、アントシアニン及びフラボノールの 7 位にも糖を転移できることが報告されている (第 15 回日本植物細胞分子生物学会発表) が、オーロンに対しては報告されていない。

pS. b UFGT1 に相同性の高い遺伝子としては、すでにタバコ由来の IS10a 及び IS5a が報告されている (Plant molecular biology, 31: 1061-1072, 1996) が、7 位への糖転移活性 (7GT 活性) については調べられていない。

今までの報告から、フラボノイドを基質とする糖転移酵素は、フラボノイド間でも基質特異性に大きな差があることが知られている。例えば、リンドウ由来のフラボノイドー 3 - 糖転移酵素遺伝子をクローン化し大腸菌で発現させ、活性を測定したところ、デルフィニジンに対する糖転移活性を 100 % とした際、シアニンに対しては 61、ペラルゴニンに対しては 38 % の活性を示し、アントシアニンに対しては良好な活性である。一方、フラボノールである、ケンフェロール、ケルセチン及びミリセチンに対してはそれぞれ、7.0 %、6.5 % 及び、4.4 % の活性しか示さない。さらに、ジヒドロフラボノールに対しては全く糖を転移しない (Tanaka et al. Plant Cell Physiol. 37, 711, 1996)。

また、ブドウ由来のフラボノイドー3-糖転移酵素遺伝子をクローン化し大腸菌で活性を測定したところ、シアニジンに対する $K_m$ は $30\mu M$ 、 $V_{max}$ は $905\text{ nkatal/s/mg}$ であるのに対し、ケルセチンに対する $K_m$ は $15\mu M$ 、 $V_{max}$ は $18.9\text{ nkatal/s/mg}$ であり、反応速度に大きな差があった (Ford et al. J. Biol. Chem. 273, 9224, 1998)。

これらの報告は、糖転移酵素はフラボノイドの種類を認識できること、およびあるフラボノイドへの糖転移活性から他のフラボノイドへの糖転移活性を容易に類推できないことを示している。

#### 発明の開示

このように、フラボノイドを基質とする糖転移酵素は、基質特異性に大きな差があり、既に知られている糖転移酵素から、特定のフラボノイドへの糖転移酵素活性を予測することは困難であった。

そこで、本発明者らは、フラボノイド色素のうち、オーロンに糖を転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を得ることを課題とし、本発明を完成した。

本発明者らは、コガネバナ由来のpS.b UFGT1遺伝子産物が、オーロンへの糖転移活性を有していることを明らかにし、この遺伝子をプローブとしてさらに金魚草 (*Antirrhinum majus*)よりオーロンに糖を転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を取得した。

また、金魚草より得られた該遺伝子をプローブとして、さらにペチュニア (*Petunia hybrida*)よりオーロンに糖を転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を2種類取得した。

従って本発明は、オーロンに糖を転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を提供する。さらには、配列番号2、8又は10に記載のアミノ酸配列を有するオーロンに糖を転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を提供する。

本発明はさらに、配列番号 2、8 又は 10 記載のアミノ酸配列に対して 1 個又は複数個のアミノ酸の付加、欠失及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されているアミノ酸配列を有し、且つオーロンに糖を転移する活性を有している蛋白質をコードする遺伝子を提供する。

本発明はさらに、配列番号：2、8 又は 10 のいずれかに記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列又はその部分を有する核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、且つオーロンに糖を転移する活性を有している蛋白質をコードする遺伝子を提供する。

本発明はまた、上記遺伝子を含んでなるベクターを提供する。

本発明はさらに、上記ベクターにより形質転換された宿主を提供する。この宿主は、微生物、植物細胞、動物細胞等の細胞であってもよく、また植物体であってもよい。

本発明はまた、上記宿主を培養、栽培または飼育することによりオーロンに糖を転移する活性を有する蛋白質の製造方法を提供することができる。

本発明はまた、オーロンを有する植物において、上記遺伝子を植物体内に導入し、該遺伝子を発現せしめ、生成した蛋白質により植物体内のオーロンに糖を転移させることにより植物体内におけるオーロンの安定化方法を提供する。

また、オーロンを持たない植物においては、オーロン合成酵素遺伝子を導入し、発現させて新たな色の花を作出する場合も、同様に本発明により得られる遺伝子を発現させることにより、オーロンを安定的に発現させることができる。

#### 図面の簡単な説明

図 1 はプラスミド pESBGT-1 の作製方法を示す図である。



図 2 はプラスミド pETAmGT1 の作製方法を示す図である。

#### 発明の実施の形態

—まず、黄色の金魚草の花弁の cDNA ライブラリーを作成する。得られた cDNA ライブラリーを、コガネバナ由来のフラボノイド 7-糖転移酵素遺伝子である pS. b UFGT1 を用いてスクリーニングし、クローンを得る。そして、このクローンから得られるプラスミドを分離し、塩基配列を決定する。

酵素活性を有する蛋白質は、その酵素活性に必須の領域と、酵素活性のために必須でない領域を有し、必須でない領域が 1 または複数個のアミノ酸の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されてもその酵素活性が維持されることが知られている。従って、本発明は、配列番号：2、8 又は 10 に示すアミノ酸配列を有する蛋白質のみならず、配列番号：2、8 又は 10 に示すアミノ酸配列において、1 個から複数個のアミノ酸配列の欠失、付加、及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されているアミノ酸配列を有し、且つオーロンに糖を転移する活性を有している蛋白質、及び該蛋白質をコードする遺伝子も本発明に含まれる。

修飾されるアミノ酸数は、例えば 50 個以下、好ましくは 30 個以下、例えば 20 個以下又は 10 個以下である。

本発明の配列番号：2、8 又は 10 に示すアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする遺伝子は、cDNA またはゲノム DNA として、金魚草又はペチュニアから得ることができる。cDNA のクローニング方法は、実施例 2～3 及び 6 に具体的に記載されている。ゲノム DNA を得るには、金魚草又はペチュニアから常法に従ってゲノムライブラリーを作製し、それを前記 cDNA 又はその断片により常法に従ってスクリーニングすることにより得ることができる。

本発明の配列番号：2、8又は10に示すアミノ酸配列に対して修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする遺伝子は、配列番号：2、8又は10に示すアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNA、例えばcDNAの塩基配列を、部位特定変異誘導、PCR法等、遺伝子を操作するため常法に従って修飾することにより作製することができる。

酵素活性を有する蛋白質をコードする遺伝子がクローニングされれば、該遺伝子又はその部分とハイブリダイズする核酸は、同様の酵素活性をコードし且つもとの蛋白質と類似するアミノ酸配列をコードしていることが多い。従って本発明は、配列番号：2、8又は10のいずれかに記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列又はその部分を有する核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、且つオーロンに糖を転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を提供する。

上記のハイブリダイゼーションの条件において、洗浄条件としては、 $5 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\% \text{ SDS}$ 、 $50^\circ\text{C}$ が好ましく、さらに好ましくは $2 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\% \text{ SDS}$ 、 $50^\circ\text{C}$ 、さらに好ましくは $0.1 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\% \text{ SDS}$ 、 $50^\circ\text{C}$ である。

また、上記のハイブリダイゼーションにおいて、配列番号：2、8又は10に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列の部分を有する核酸を使用する場合、その核酸の長さは少なくとも17塩基対の長さを有し、好ましくは少なくとも100塩基対の長さを有する。ハイブリダイゼーションの対象となる核酸としては、例えばコガネバナ、金魚草、ペチュニア、スターチス、アサガオ、ダリア、ムギワラギク、キクイモなどから調製した核酸、好ましくはゲノムDNAライブラリー又はcDNAライブラリーが使用される。

本発明はまた、オーロンへの糖転移活性を有する上記の蛋白質の

製造方法を提供する。この方法は、前記の蛋白質をコードするDNAを含んでなるベクターを宿主に導入し、そして該宿主を培養し、又は成育させ、そして所望により前記蛋白質を採取することを特徴とする。宿主としては宿主細胞でもよく、また植物等の生物体であってもよい。

宿主細胞としては、原核細胞、特に細菌細胞、例えば大腸菌 (*Escherichia coli*)、バシルス (*Bacillus*) 属細菌、例えばバシルス・サブチリス (*Bacillus subtilis*)、バシルス・ブレビス (*Bacillus Brevis*)等、下等真核生物、例えば真菌類、例えば酵母、例えばサッカロミセス (*Saccharomyces*)属酵母、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、あるいは糸状菌、例えばアスペルギルス (*Aspergillus*)属糸状菌、例えばアスペルギルス・オリゼー (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)等が挙げられる。

さらに高等真核生物細胞宿主としては、昆虫細胞、例えばカイコの細胞、動物細胞、例えばCHO細胞、ヒト培養細胞、例えばHeLa細胞等が挙げられる。

本発明の遺伝子はまた、生物体、例えば植物等において発現せしめることができる。

本発明のDNAを含んでなるベクター、特に発現ベクターは発現制御領域を含有し、発現制御領域は宿主細胞に依存する。例えば、細菌発現ベクターのプロモーターとしては、trcプロモーター、tacプロモーター、lacプロモーター、T7プロモーター等を使用することができ、酵母発現ベクターのプロモーターとしては、例えば解糖系酵素遺伝子のプロモーター、例えばグリセロアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼプロモーター、ガラクトキナーゼプロモーター等を使用することができ、また、動物細胞用発現ベクターのプロモ-

ターとしては、ウイルスプロモーターを使用することができる。

培養物から、オーロンに糖を転移する活性を有する蛋白質を採取するには、液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等、蛋白質の単離、精製に用いられる常用手段を用いることができる。

現在の技術水準をもってすれば、さらに、このcDNAを、構成的なあるいは誘導型のプロモーターの制御下に連結し、アグロバクテリウムを用いるシステムあるいはパーティクルガン、エレクトロポレーションを用いるシステムで、植物例えばペチュニア、バラ、カーネーション、キク、トレニア、バーベナ、ガーベラ、タバコ、イチゴ、トルコギキョウ、リンドウ、グラジオラス、チューリップ等に導入すれば、花卉などでオーロンに糖を転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を発現させることも可能である。

オーロンに糖を転移する活性を有する蛋白質が発現した花卉などではオーロンが配糖化され、オーロンが安定化することが予想される。このようにして得られた植物は、従来の品種には存在しないような色調の花を提供することができる。

また、オーロンを持たない植物においては、オーロン合成酵素遺伝子を導入し、発現させ、さらに本発明のオーロンに糖を転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を同時に導入し、発現させることにより、オーロンを安定的に発現させ、黄色の色調を有する新たな植物を提供することができる。前記オーロンを持たない植物としてはペチュニア、トレニア、タバコなどが挙げられる。

## 実施例

以下に本発明の実施例を示し、発明を詳細に述べる。

### 実施例 1. コガネバナ由来 pS.b UFGT1 遺伝子産物のオーロンへの

### 糖転移活性の測定

コガネバナ由来 pS. b UFGT1 遺伝子のオーロンへの糖転移活性について、以下に記載の方法により作製した大腸菌での発現ベクター pESBGT-1 を用いて測定した。

まず、pS. b UFGT1 遺伝子を以下の 2 種類のプライマーを用いて PCR 反応を行い、NdeI 及び BamHI サイトを導入した。

5'-ATA ACT ACA TAT GGG ACA ACT CCAC-3' (配列番号: 3)

5'-CAG AAC AGG ATC CAC ACG TAA TTT A-3' (配列番号: 4)

PCR 反応液は、pSBGT-1 300ng、1x Native Pfu DNA ポリメラーゼ反応緩衝液 (Stratagene)、0.2mM dNTPs、プライマー各 4pg/ $\mu$ l、Native Pfu DNA ポリメラーゼ 2.5U からなる総体積 50  $\mu$ l に調整した。反応は、95°C で 3 分反応させた後、95°C・1 分、50°C・2 分及び 72°C・2 分の反応を 1 サイクルとし、30 サイクル行い、最後に 72°C で 7 分間処理した。

得られた PCR 産物を NdeI 及び BamHI で消化し、同じく NdeI 及び BamHI で消化した pET-3a ベクター (Stratagene) と連結し、pESBGT-1 を構築した (図 1)。pESBGT-1 および pET-3a ベクターを用いて、それぞれエピクリアン・コリ (Epicurian Coli) BL21(DE3) (Stratagene) に形質転換した。形質転換株は、アンピシリン 50  $\mu$ g/ml を含む LB 培地 3 ml で 37°C で一晩振とう培養した。その前培養 500  $\mu$ l を、アンピシリン 50  $\mu$ g/ml を含む LB 培地 50ml に加え A600 = 0.6 ~ 1.0 に達するまで培養した後、IPTG (イソプロピル - $\beta$ -D- チオガラクトピラノシド) を終濃度 0.5mM になるよう加え、28°C で 4 時間培養し、冷却遠心機 (5000rpm, 10 分間、4°C) で、集菌した。

ペレットを 5 ml の緩衝液 (10mM リン酸ナトリウム、pH 6.5, 1mM  $\beta$ -メルカプトエタノール (2-ME)) に懸濁し、超音波破碎機で大腸菌を破碎した後、遠心分離 (15,000rpm, 5 分、4°C) し、得られた

上清を粗酵素液とし、以下の酵素反応に用いた。

酵素活性はオーレウシジンに加えて、ナリンゲニン又はルテオリンを基質として測定した。

—オーレウシジンについては、以下のように酵素活性を測定した。

粗酵素液 50  $\mu$ l に 0.1M Tris-HCl, pH8.0, 0.05% 2-ME 150  $\mu$ l を加え、30℃で10分間保温した。その後 4.66mM オーレウシジン 5  $\mu$ l、5mM UDP-グルコース 50  $\mu$ l を加え、30℃で1時間反応させた。5% TFA (トリフルオロ酢酸) を含む 90% アセトニトリル 200  $\mu$ l を加え、反応を停止させた後、15,000 rpm、3分、4℃で遠心分離し、得られた上清をフィルター (ポアサイズ 0.45  $\mu$ m、4 mm Millex-LH、ミリポア) を用いて不溶物を除去した。これを液体高速クロマトグラフィーで分析した。

分析条件は以下の通りである。カラムは Asahipak-ODP-50 (4.6mm  $\phi$  x 250mm、昭和電工) を用いて、移動相には A 溶液として TFA 0.1% を含む H<sub>2</sub>O、B 溶液として TFA 0.1% を含む 90% CH<sub>3</sub>CN を用い、B 液 20% から B 液 100% のリニアグラジエント 20 分間の後 B 100% を 5 分間保持した。流速は 0.6ml/min. で行った。検出は A 380nm 及び島津 PDA 検出器 SPD-M6A で 250-400nm の吸収スペクトルを測定した。

pESBGT-1 を発現させた大腸菌の粗抽出液を反応させたものでは、基質のオーレウシジン (保持時間 18.1 分) に加え、9.7 分、12.0 分及び 13.1 分に溶出される新たな物質が検出された。これらは pET-3a ベクターを発現させた大腸菌から同様に調製した粗抽出液を反応させたものでは、検出されなかったことから pESBGT-1 に由来する蛋白質によって生じた産物と考えられる。これらの産物のうち、12.0 分に溶出される物質は、オーレウシジン 6-グリコシドと保持時間および吸収スペクトルが一致した。他の産物においても吸収スペクトルからオーレウシジン配糖化物と判断される。

また、ナリンゲニン及びルテオリンについては以下のように酵素活性を測定した。

粗酵素液  $20\mu\text{l}$ 、 $0.1\text{M}$  クエン酸-リン酸緩衝液、 $\text{pH } 6.5$ 、 $25\mu\text{l}$  -  $5\mu\text{M}$  の各基質  $5\mu\text{l}$ 、 $5\text{mM}$  UDP-グルコース  $25\mu\text{l}$  を含む総体積  $250\mu\text{l}$  で  $30^\circ\text{C}$ 、30分間反応させた。 $5\%$  TFAを含む  $90\%$  アセトニトリル  $200\mu\text{l}$  を加えて反応を停止させた後、 $15,000\text{ rpm}$ 、3分、 $4^\circ\text{C}$  で遠心分離し、得られた上清をフィルター（ポアサイズ  $0.45\mu\text{m}$ 、 $4\text{ mm}$  Millex-LH、ミリポア）を用いて不溶物を除去した。これを高速液体クロマトグラフィーで分析した。

ナリンゲニンの分析条件は以下の通りである。カラムは YMC J'sphere ODS-M80 ( $4.6\text{mm}\phi \times 150\text{mm}$ 、YMC) を用いて、移動相には A 溶液として TFA  $0.1\%$  を含む  $\text{H}_2\text{O}$ 、B 溶液として TFA  $0.1\%$  を含む  $90\%\text{CH}_3\text{CN}$  を用い B  $20\%$  から B  $80\%$  のリニアグラジエント 10分間の後 B  $80\%$  を 5分間保持した。流速は  $0.6\text{ml/min.}$  で行った。検出は A  $290\text{nm}$  及び島津 PDA 検出器 SPD-M6A で  $250 \sim 400\text{nm}$  の吸収スペクトルを測定した。

ルテオリンの分析条件は以下の通りである。YMC J'sphere ODS-M80 ( $4.6\text{mm}\phi \times 150\text{mm}$ ) を用いて、移動相には A 溶液として TFA  $0.1\%$  を含む  $\text{H}_2\text{O}$ 、B 溶液として TFA  $0.1\%$  を含む  $90\%\text{CH}_3\text{CN}$  を用い B  $20\%$  から B  $80\%$  のリニアグラジエント 10分間の後 B  $80\%$  を 5分間保持した。流速は  $0.6\text{ml/min.}$  で行った。検出は A  $330\text{nm}$  及び島津 PDA 検出器 SPD-M6A で  $250 \sim 400\text{nm}$  の吸収スペクトルを測定した。

ナリンゲニンを基質とした場合、ナリンゲニン（保持時間  $9.7\text{分}$ ）に加え、 $6.9\text{分}$  に溶出される新たな物質が検出された。この物質は、pET-3aベクターを発現させた大腸菌から同様に調製した粗抽出液を反応させたものでは、検出されなかった。ナリンゲニン 7-グリコシドと保持時間は一致したものの吸収スペクトルが一致せず、複数のナリンゲニングルコシドが、それぞれ微量存在しているこ

とが示唆される。

ルテオリンを基質とした場合、ルテオリン（保持時間 9.3分）に加え、6.4分、7.7分、8.0分に溶出されるpET-3aベクターを発現させた大腸菌から同様に調製した粗抽出液を反応させたものでは、検出されなかった新たな物質が検出された。このうち6.4分に溶出される物質は、ルテオリン7-グリコシドと保持時間が一致した。

以上のことから、コガネバナ由来pS.b UFGT1遺伝子は、オーレウシジンを配糖化できる酵素であることが、明らかになった。また、ルテオリンも配糖化できるが、ナリンゲニンに対しては、ほとんど働かないことが明らかになった。

すでにバイカレイン (baicalein) に対しては、7位に配糖化できることが明らかになっている。バイカレイン (baicalein) に対しては、反応後、ほぼ100%が7配糖化物として検出されるにも関わらず、ナリンゲニンに関してはほとんど反応せず、コガネバナpS.b UFGT1遺伝子発現産物もまた基質特異性の高いことが明らかとなった。

#### 実施例 2. 金魚草花卉cDNAライブラリーの構築

花卉のcDNAライブラリーは以下の方法により作製した。黄色の金魚草（エローバタフライ）の新鮮な花卉5gからR. McGookinらのMethod in Molecular Biology vol. 2 (Humana Press Inc. 1984) に詳細に示されているチオシアン酸グアニジン・塩化セシウムを用いる方法でRNAを得、オリゴテックスdT30（日本ロシュ）を用いてpolyA+RNAを精製した。このpolyA+RNAから、cDNA合成キット、Uni-XRベクターキット（Stratagene）を用いて、cDNAライブラリーを構築した。得られたライブラリーは、 $1.6 \times 10^5$  プラーク形成ユニット (pfu) からなっていた。

#### 実施例 3. 完全長オーロン糖転移酵素遺伝子の取得

実施例 2 により得られた金魚草cDNAライブラリーを、コガネバナ



毛状根由来フラボノイド 7-糖転移酵素遺伝子である pS. b UFGT1 の全長を用いてスクリーニングした。ライブラリーのスクリーニングはノンラジオシステム DNA 検出キット (ベーリンガー) を用いて行った。ハイブリダイゼーションは、37℃で一晩行い、フィルターの洗浄は 5 x SSC、0.1% SDS を用いて 50℃で 30 分間行った。約 20 万 プラークをスクリーニングし、最終的に 2 つのクローンを得た。方法は Molecular Cloning (Sambrook et. al. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989) によった。

2 つのクローンは、まったく同じ長さの配列をコードしていたので、一方を pAmGT1 と名づけ、塩基配列を決定した。

塩基配列はオリゴヌクレオチドプライマーを合成し、DNA Sequencer model 310 (Applied Biosystems) を用いて決定した。塩基配列と推定アミノ酸配列を配列表・配列番号 1 に示した。

pAmGT1 は、481 アミノ酸からなる分子量 53.9 kDa の蛋白質をコードする 1751 bp の遺伝子 AmGT1 を含んでいた。

#### 実施例 4. 大腸菌における AmGT1 cDNA の発現

AmGT1 遺伝子の発現は、pET System (Stratagene) を用いて行った。

最初に、NdeI 及び BamHI サイトを導入するために、以下に示すプライマー 2 種 pETAmGT5' 及び pETAmGT3' を用いて PCR 反応を行った。

pETAmGT5': 5'-ATA ACT ACA TAT GGG AAA ACT TCA C-3' (配列番号: 5)

pETAmGT3': 5'-GAA CAG GAT CCA CAC ACT AGA AGT CA-3' (配列番号: 6)

PCR 反応液は、pAmGT1 100 ng、1x クローン化 Pfu DNA ポリメラーゼ反応緩衝液 (Stratagene)、0.2 mM dNTPs、プライマー各 0.5 pmol

1/ $\mu$ l、クローン化Pfu DNA ポリメラーゼ 5.0 Uからなる総体積 100 $\mu$ lに調整した。反応は、95℃で45秒反応させた後、95℃・45秒、50℃・45秒及び72℃・2分の反応を25サイクル行い、最後に72℃で10分間処理した。得られたPCR産物をpCR2.1 TOPO ベクター (INVITROGEN) にサブクローニングした。

このようにして得られたプラスミドpTOPO-ETAmGT1 のいくつかのクローンをM13 Reverse Primer及びM13(-20)プライマー (TOYOBO) を用いてABI PRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)を用いて反応し、DNA Sequencer model 310 (Applied Biosystems)を用いて、両端の塩基配列を確認した。pTOPO-ETAmGT1 をNdeI、BamHI およびScaIで制限酵素処理し得られた約2.7Kb のフラグメントを pET-3a ベクター (Stratagene) のNdeIとBamHI サイトに連結し、プラスミドpETAmGT1を得た (図2)。pETAmGT1を用いて、エピクリアン・コリ (Epicuriana Coli) BL21(DE3) (Stratagene)に形質転換した。

#### 実施例 5. AmGT1 cDNA組換え蛋白の糖転移酵素活性の測定

実施例 4 にて得られた形質転換株は、実施例 1 に示したように培養、抽出し、酵素活性を測定した。

オーレウシジンを基質とした場合、オーレウシジン (保持時間16.6分) に加え、10.98分、11.27分及び 11.85分に溶出される新たな物質が検出された。これらはpET-3aベクターを発現させた大腸菌から同様に調製した粗抽出液を反応させたものでは、検出されなかったことからpESBGT-1に由来する蛋白質によって生じた産物と考えられる。

これらの産物のうち、10.98分に展開される物質は、オーレウシジン 6-グリコシドと 11.85分に展開される物質は、オーレウシジン 4-グリコシドと保持時間が一致した。

以上の結果からAmGT1 は、オーレウシジンの6位及び4位を配糖化できることが明らかになった。11.27分に検出される物質についてもその吸収スペクトルからオーレウシジン配糖化物であろうと推察される。

#### 実施例 6. ペチュニア由来のオーロン糖転移酵素遺伝子の取得

ペチュニア品種オールドグローリーブルーの花弁由来のcDNA libraryを使用し(Nature366, 276-279, 1993)、実施例3で得られた遺伝子AmGT1の全長を用いてスクリーニングした。ライブラリーのスクリーニングはノンラジオシステムDNA検出キット(ベーリンガー)を用いて行った。ハイブリダイゼーションは、37℃で一晩行い、フィルターの洗浄は5 x SSC, 0.1% SDSを用いて50℃で30分間行った。約20万プラークをスクリーニングし、最終的に2種類のクローンを得た。方法はMolecular Cloning (Sambrook et.al. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989)によった。

2種類のクローンをそれぞれpPh7GTa及びpPh7GTbと名づけ、塩基配列を決定した。塩基配列はオリゴヌクレオチドプライマーを合成し、DNA Sequencer model 310 (Applied Biosystems)を用いて決定した。pPh7GTa中の挿入部の塩基配列と推定アミノ酸配列をそれぞれ配列番号: 7及び8に示し、そしてpPh7GTb中の挿入部の塩基配列及び推定アミノ酸配列をそれぞれ配列番号: 9及び10に示す。

#### 実施例 7. オーロン配糖化酵素遺伝子の構造解析

pPh7GTaは、488アミノ酸からなる蛋白質をコードする1750bpの遺伝子Ph7GTaを含んでおり、pPh7GTbは、476アミノ酸からなる蛋白質をコードする1669bpの遺伝子Ph7GTbを含んでいた。得られた推定アミノ酸配列を用いて、実施例3で得られた金魚草由来のAmGT1、コガネバナ由来のpS.b UFGT1と各々比較したところ、Ph7GTaは、AmGT1及びpS.b UFGT1とは、それぞれ50%及び51%の相同性を示し

た。その他にpS.b UFGT1に相同性の高い遺伝子として既に報告されているタバコ由来のIS5a及びIS10aと比較したところ、それぞれ59%及び60%の相同性を示した。同様に、Ph7GTbはAmGT1及びpS.b UFGT1とは、それぞれ59%及び56%の相同性を示し、タバコ由来のIS5a及びIS10aと88%及び86%の相同性を示した。

一方、フラボノイドの3位を配糖化する酵素遺伝子 (Tanaka et al. (1996) Plant Cell and Physiology 37:711-716; Frutek D, Schiefelbein JW, Johnston F, Nelson Jr, OE (1988) Plant molecular biology 11:473-481, Wise RP, Rohde W, Salamini F (1990) Plant molecular biology 14:277-279) や、フラボノイドの5位を配糖化する酵素遺伝子 (W099/05287) とは20~25%程度の相同性しかなく、Ph7GTa、Ph7GTbともAmGT1及びpS.b UFGT1と同様にフラボノイド 7-糖転移酵素遺伝子と予想された。

#### 実施例 8. 大腸菌におけるPh7GTa及びPh7GTbのcDNAの発現

Ph7GTa遺伝子の発現は、pET System (Stratagene) を用いて行った。最初にNdeI及びBamHI サイトを導入するために、以下に示すプライマー 2 種 pETPh7GTa5' [5'-ATA ACT ACA TAT GGC TAT TCC CAC A-3' (配列番号: 11)] 及び pETPh7GTa3' [5'-GAA CAG GAT CCT AAA AGG ACC T-3' (配列番号: 12)] を用いてPCR 反応を行った。

PCR 反応液は、pAmGT1 100ng, 1xクローン化Pfu DNA ポリメラーゼ反応緩衝液 (Stratagene), 0.2mM dNTPs、プライマー各0.5pmol/ $\mu$ l、クローン化Pfu DNA ポリメラーゼ5.0Unit からなる総体積100  $\mu$ l に調整した。反応は、95℃で45秒反応させた後、95℃・45秒、50℃・45秒、72℃・2分の反応を25サイクル行い、最後に72℃で10分間処理した。得られたPCR 産物をpCR2.1 TOPO ベクター (INVITROGEN) にサブクローニングした。このようにして得られたプラス

ミドpTOPO-ETPh7GTaのいくつかのクローンを ABI PRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)を用いて反応し、DNA Sequencer model 310 (Applied Biosystems)を用いて、全塩基配列を確認した。pTOPO-ETPh7GTaをNdeIおよびBamHIで制限酵素処理し得られた約1.7KbのフラグメントをpET-3aベクター (Stratagene) のNdeIとBamHIサイトに連結し、プラスミドpETPhGTaを得た。

pETPhGTaを用いて、エピクリアン・コリ (Epicurian Coli) BL21 (DE3)(Stratagene)に形質転換した。

同様にしてPh7GTbについてもNdeI、BamHIサイトを導入するために、以下に示すプライマー2種pETPh7GTb5' [5'-ATA ACT ACA TAT GGG TCA GCT CCA-3' (配列番号: 13)] 及びpETPh7GTb3' [5'-C TC GTA CCA TGG AAA ACT ATT CT-3' (配列番号: 14)]を用いてPCR反応を行った後、同様にしてプラスミドpETPhGTbを得た。

#### 実施例 9. Ph7GTa、Ph7GTb cDNA 組換え蛋白の糖転移酵素活性の測定

実施例 8 にて得られた形質転換株は、実施例 1 に示したように培養、抽出し、酵素活性を測定した。酵素活性は、オーレウシジンを基質として、測定した。酵素活性は実施例 1 で述べたのと同様に測定した。Ph7GTa及びPh7GTbについては、反応産物としてオーレウシジン 6-グリコシドと保持時間及びスペクトルが一致するピークが検出された。また、Ph7GTaについては、他に吸収スペクトルからオーロン配糖体と予想されるピークが、1種類、Ph7GTbについては、2種類えられた。

以上の結果からPh7GTa及びPh7GTbは、オーレウシジンを配糖化する活性を持つ酵素をコードすることが明らかになった。

### 産業上の利用可能性

本発明により得られた遺伝子発現産物を用いて、オーロンを配糖化させることができた。これにより、オーロンの植物細胞内における安定発現が可能となった。

## 請 求 の 範 囲

1. オーロンに糖を転移する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子。
2. 配列番号 2、8 又は 10 記載のアミノ酸配列を有し、且つオーロンに糖を転移する活性を有している蛋白質をコードする請求項 1 記載の遺伝子。
3. 配列番号 2、8 又は 10 記載のアミノ酸配列に対して 1 個又は複数個のアミノ酸の付加、欠失及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されているアミノ酸配列を有し、且つオーロンに糖を転移する活性を有している蛋白質をコードする請求項 1 記載の遺伝子。
4. 配列番号：2、8 又は 10 に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列又はその部分を有する核酸とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、且つオーロンに糖を転移する活性を有している蛋白質をコードする請求項 1 に記載の遺伝子。
5. 請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子を含んでなるベクター。
6. 請求項 5 に記載のベクターにより形質転換された宿主。
7. 請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子によってコードされる蛋白質。
8. 請求項 6 に記載の宿主を培養し、又は成育させ、そして該宿主からオーロンに糖を転移する活性を有する蛋白質を採取することの特徴とする該蛋白質の製造方法。
9. 請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子が導入された植物もしくはこれと同じ性質を有するその子孫又はそれらの組織。
10. 請求項 9 に記載の植物またはこれと同じ性質を有するその子

孫の切花。

11. 請求項 7 記載の蛋白質を作用させてオーロンに糖を転移することを特徴とするオーロンの安定化方法。

12. 請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子を植物体内に導入し、該遺伝子を発現せしめ、そして生成した蛋白質により植物体内のオーロンに糖を転移することを特徴とする植物体内におけるオーロンの安定化方法。



Fig. 1

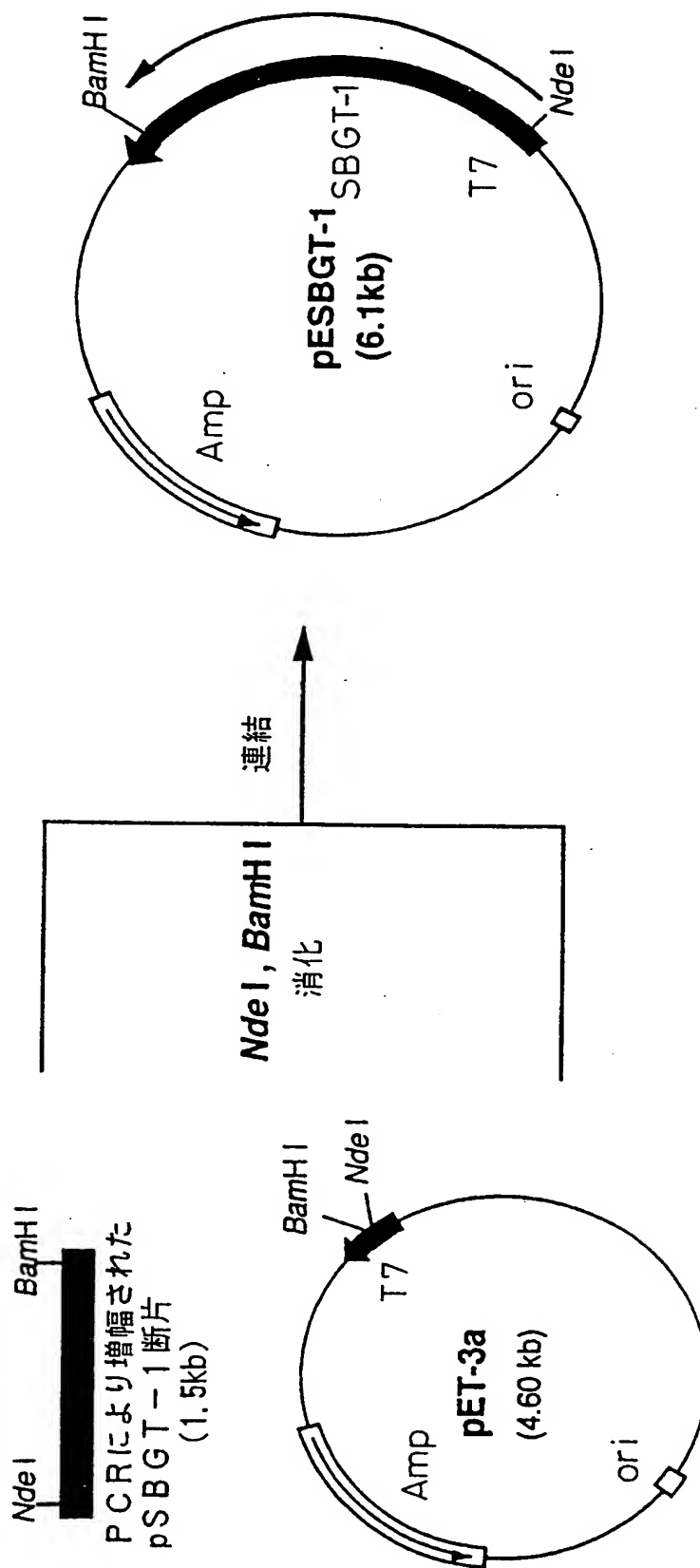
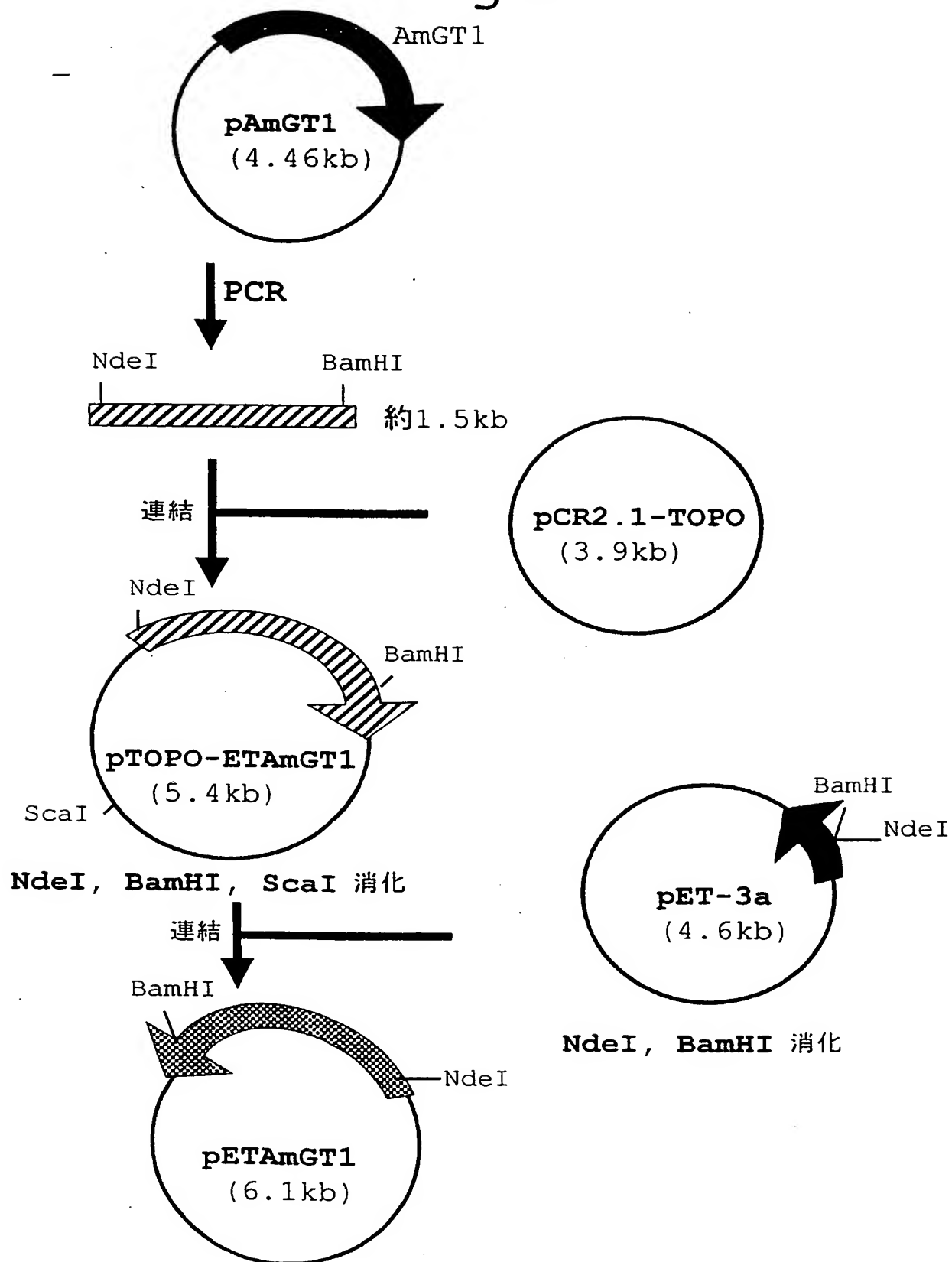


Fig.2



## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; SUNTORY LIMITED

<120> Gene coding for a protein having glycosyl transferase  
to aurone

&lt;160&gt; 6

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1751

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Antirrhinum majus

&lt;220&gt;

<223> Nucleotide sequence coding for a protein having glycosyl  
transferase to aurone

&lt;400&gt; 1

ctcacttagt actaaaacac aaaactgaga acccttcaaa ttccacttg atcatattca 60

attttccttt taaaa atg gga aaa ctt cac att gcc tta ttt cca gtt atg 111

Met Gly Lys Leu His Ile Ala Leu Phe Pro Val Met

1

5

10

gct cat ggt cac atg atc cca atg ttg gac atg gcc aag ctc ttt acc 159

Ala His Gly His Met Ile Pro Met Leu Asp Met Ala Lys Leu Phe Thr

15

20

25

tca aga ggc ata caa aca aca atc att tcg act ctc gcc ttc gct gat 207

Ser Arg Gly Ile Gln Thr Thr Ile Ile Ser Thr Leu Ala Phe Ala Asp

30

35

40

ccg ata aac aaa gct cgt gat tcg ggc ctc gat att gga cta agc atc 255

Pro Ile Asn Lys Ala Arg Asp Ser Gly Leu Asp Ile Gly Leu Ser Ile

45

50

55

60

ctc aaa ttc cca cca gaa gga tca gga ata cca gat cac atg gtg agc	303
Leu Lys Phe Pro Pro Glu Gly Ser Gly Ile Pro Asp His Met Val Ser	
65 70 75	
ctt gat cta gtt act gaa gat tgg ctc cca aag ttt gtt gag tca tta	351
Leu Asp Leu Val Thr Glu Asp Trp Leu Pro Lys Phe Val Glu Ser Leu	
80 85 90	
gtc tta tta caa gag cca gtt gag aag ctt atc gaa gaa cta aag ctc	399
Val Leu Leu Gln Glu Pro Val Glu Lys Leu Ile Glu Glu Leu Lys Leu	
95 100 105	
gac tgt ctc gtt tcc gac atg ttc ttg cct tgg aca gtc gat tgt gcg	447
Asp Cys Leu Val Ser Asp Met Phe Leu Pro Trp Thr Val Asp Cys Ala	
110 115 120	
gct aag ttc ggt att ccg agg ttg gtt ttc cac gga acg agc aac ttt	495
Ala Lys Phe Gly Ile Pro Arg Leu Val Phe His Gly Thr Ser Asn Phe	
125 130 135 140	
gcg ttg tgt gct tcg gag caa atg aag ctt cac aag cct tat aag aat	543
Ala Leu Cys Ala Ser Glu Gln Met Lys Leu His Lys Pro Tyr Lys Asn	
145 150 155	
gta act tct gat act gag aca ttt gtt ata ccg gat ttc ccg cat gag	591
Val Thr Ser Asp Thr Glu Thr Phe Val Ile Pro Asp Phe Pro His Glu	
160 165 170	
ctg aag ttt gtg agg act caa gtg gct ccg ttt cag ctt gcg gaa acg	639
Leu Lys Phe Val Arg Thr Gln Val Ala Pro Phe Gln Leu Ala Glu Thr	
175 180 185	
gag aat gga ttc tca aag ttg atg aaa cag atg acg gag tct gtt ggt	687
Glu Asn Gly Phe Ser Lys Leu Met Lys Gln Met Thr Glu Ser Val Gly	
190 195 200	

3 / 2 3

ata ctc gat cat cct gcg gta gga gct ttc gtg acg cat tgt gga tgg 1167  
 lle Leu Asp His Pro Ala Val Gly Ala Phe Val Thr His Cys Gly Trp  
 350 355 360  
 aat tcg acg ttg gaa gga ata tgc gcc ggt gtg cct atg gtg act tgg 1215  
 Asn Ser Thr Leu Glu Gly Ile Cys Ala Gly Val Pro Met Val Thr Trp  
 365 370 375 380  
 cca gtt ttc gca gag cag ttt ttc aat gag aag ttt gtg aca gag gtt 1263  
 Pro Val Phe Ala Glu Gln Phe Phe Asn Glu Lys Phe Val Thr Glu Val  
 385 390 395  
 ttg ggg acc ggt gtt tcg gtt ggg aat aag aag tgg cta agg gca gca 1311  
 Leu Gly Thr Gly Val Ser Val Gly Asn Lys Lys Trp Leu Arg Ala Ala  
 400 405 410  
 agt gaa ggt gtg tcg agg gag gca gtg acg aac gcg gtg cag cgt gtt 1359  
 Ser Glu Gly Val Ser Arg Glu Ala Val Thr Asn Ala Val Gln Arg Val  
 415 420 425  
 atg gtg gga gaa aat gcg tcg gag atg aga aag cga gcg aag tat tat 1407  
 Met Val Gly Glu Asn Ala Ser Glu Met Arg Lys Arg Ala Lys Tyr Tyr  
 430 435 440  
 aag gaa atg gcg agg cgg gcg gtt gag gaa ggc ggt tcg tct tat aat 1455  
 Lys Glu Met Ala Arg Arg Ala Val Glu Glu Gly Gly Ser Ser Tyr Asn  
 445 450 455 460  
 ggt ttg aat gag atg ata gag gat ttg agt gtg tac cgt gct cca gaa 1503  
 Gly Leu Asn Glu Met Ile Glu Asp Leu Ser Val Tyr Arg Ala Pro Glu  
 465 470 475  
 aaa caa gac tta aac tagattctta tagatgactt ctagtgtgac aattgtaatt 1558  
 Lys Gln Asp Leu Asn  
 480

ttttgccttt tattcaagtt tcctcattag tgttgagagc tttccctgta ttttcagaat 1618  
 tggtttggtc aatttttaca tgatttgga tagatagctg catagtttct agctgttaac 1678  
 attgtttgat catattgagt tgatttaaaa tgagagtagc atgtgatctt cagattaaaa 1738  
 aaaaaaaaaa aaa 1751

<210> 2

<211> 481

<212> PRT

<213> Antirrhinum majus

<220>

<223> Amino acid sequence of a protein having glycosyl transferase to aurone

<400> 2

Met Gly Lys Leu His Ile Ala Leu Phe Pro Val Met Ala His Gly His

1 5 10 15

Met Ile Pro Met Leu Asp Met Ala Lys Leu Phe Thr Ser Arg Gly Ile

20 25 30

Gln Thr Thr Ile Ile Ser Thr Leu Ala Phe Ala Asp Pro Ile Asn Lys

35 40 45

Ala Arg Asp Ser Gly Leu Asp Ile Gly Leu Ser Ile Leu Lys Phe Pro

50 55 60

Pro Glu Gly Ser Gly Ile Pro Asp His Met Val Ser Leu Asp Leu Val

65 70 75 80

Thr Glu Asp Trp Leu Pro Lys Phe Val Glu Ser Leu Val Leu Leu Gln

85 90 95

Glu Pro Val Glu Lys Leu Ile Glu Glu Leu Lys Leu Asp Cys Leu Val

100 105 110

Ser Asp Met Phe Leu Pro Trp Thr Val Asp Cys Ala Ala Lys Phe Gly  
 115 120 125  
 Ile Pro Arg Leu Val Phe His Gly Thr Ser Asn Phe Ala Leu Cys Ala  
 — 130 135 140  
 Ser Glu Gln Met Lys Leu His Lys Pro Tyr Lys Asn Val Thr Ser Asp  
 145 150 155 160  
 Thr Glu Thr Phe Val Ile Pro Asp Phe Pro His Glu Leu Lys Phe Val  
 165 170 175  
 Arg Thr Gln Val Ala Pro Phe Gln Leu Ala Glu Thr Glu Asn Gly Phe  
 180 185 190  
 Ser Lys Leu Met Lys Gln Met Thr Glu Ser Val Gly Arg Ser Tyr Gly  
 195 200 205  
 Val Val Val Asn Ser Phe Tyr Glu Leu Glu Ser Thr Tyr Val Asp Tyr  
 210 215 220  
 Tyr Arg Glu Val Leu Gly Arg Lys Ser Trp Asn Ile Gly Pro Leu Leu  
 225 230 235 240  
 Leu Ser Asn Asn Gly Asn Glu Glu Lys Val Gln Arg Gly Lys Glu Ser  
 245 250 255  
 Ala Ile Gly Glu His Glu Cys Leu Ala Trp Leu Asn Ser Lys Lys Gln  
 260 265 270  
 Asn Ser Val Val Tyr Val Cys Phe Gly Ser Met Ala Thr Phe Thr Pro  
 275 280 285  
 Ala Gln Leu Arg Glu Thr Ala Ile Gly Leu Glu Glu Ser Gly Gln Glu  
 290 295 300  
 Phe Ile Trp Val Val Lys Lys Ala Lys Asn Glu Glu Glu Gly Lys Gly  
 305 310 315 320



&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt;

ataactacat atgggacaac tccac

25

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 4

cagaacagga tccacacgta attta

25

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 5

ataactacat atgggaaaac ttcac

25

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 6

gaacaggatc cacacactag aagtca

26

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 1750

&lt;212&gt; DNA

<213> *Petunia hybrida*

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Nucleotide sequence coding for a protein having glycosyl transferase to aurone

&lt;400&gt; 7

ccaaattctc tgatctttcc actaataatt tccca atg gct att ccc aca gtg 53

Met Ala Ile Pro Thr Val

1

5

caa cca cat ttt gtg ctg ctt cct ttc atg gca caa ggc cat aca aat 101

Gln Pro His Phe Val Leu Leu Pro Phe Met Ala Gln Gly His Thr Asn

10

15

20

ccc atg att gac atc gca cgc cta ttg gca caa cgc gga gtt ata atc 149

Pro Met Ile Asp Ile Ala Arg Leu Leu Ala Gln Arg Gly Val Ile Ile

25

30

35

acc att ctt act aca cac ttt aat gcc act aga ttc aag aca gtc gtt 197

Thr Ile Leu Thr Thr His Phe Asn Ala Thr Arg Phe Lys Thr Val Val

40

45

50

gat cgg gca gta gtg gca gca cta aag att cag gta gtt cac ctc tat 245

Asp Arg Ala Val Val Ala Ala Leu Lys Ile Gln Val Val His Leu Tyr

55

60

65

70

ttt cca agc tta gag gct gga cta cct gaa ggg tgt gaa gct ttc gac 293

Phe Pro Ser Leu Glu Ala Gly Leu Pro Glu Gly Cys Glu Ala Phe Asp

75

80

85

atg ctt cct tca atg gat ttc gca atg aaa ttc ttt gat gct acc agt 341  
 Met Leu Pro Ser Met Asp Phe Ala Met Lys Phe Phe Asp Ala Thr Ser  
 90 95 100  
 agg ctt caa cca caa gtg gaa gaa atg ctt cat gaa ctg caa ccg tca 389  
 Arg Leu Gln Pro Gln Val Glu Glu Met Leu His Glu Leu Gln Pro Ser  
 105 110 115  
 cca agt tgc ata ata tct gat atg tgt ttt cca tgg aca act aat gtt 437  
 Pro Ser Cys Ile Ile Ser Asp Met Cys Phe Pro Trp Thr Thr Asn Val  
 120 125 130  
 gca caa aaa ttc aac att cct agg ctt gtt ttt cat ggg atg tgc tgt 485  
 Ala Gln Lys Phe Asn Ile Pro Arg Leu Val Phe His Gly Met Cys Cys  
 135 140 145 150  
 ttt tct tta ttg tgc ttg cac aat ttg aga gat tgg aag gag ttg gag 533  
 Phe Ser Leu Leu Cys Leu His Asn Leu Arg Asp Trp Lys Glu Leu Glu  
 155 160 165  
 tct gat ata gaa tat ttt caa gtt cca gga tta cat gac aaa att gaa 581  
 Ser Asp Ile Glu Tyr Phe Gln Val Pro Gly Leu His Asp Lys Ile Glu  
 170 175 180  
 tta aac aaa gct cag ctt tca aat att gtt aag cca aga ggt cct gat 629  
 Leu Asn Lys Ala Gln Leu Ser Asn Ile Val Lys Pro Arg Gly Pro Asp  
 185 190 195  
 tgg aat gaa ttt gca gat caa ctg aag aaa gca gaa gaa gaa gct tat 677  
 Trp Asn Glu Phe Ala Asp Gln Leu Lys Lys Ala Glu Glu Glu Ala Tyr  
 200 205 210  
 ggg ata gta gct aat agc ttt gaa gag tta gaa cca gaa tat gtc aag 725  
 Gly Ile Val Ala Asn Ser Phe Glu Glu Leu Glu Pro Glu Tyr Val Lys  
 215 220 225 230

gga ttg gaa aag gca aaa ggc ttg aaa att tgg cca att ggt cct gtt	773
Gly Leu Glu Lys Ala Lys Gly Leu Lys Ile Trp Pro Ile Gly Pro Val	
235 240 245	
tct ttg tgc aac aaa gag aaa cag gac aag gct gaa aga gga aac aag	821
Ser Leu Cys Asn Lys Glu Lys Gln Asp Lys Ala Glu Arg Gly Asn Lys	
250 255 260	
gct tca att gat gaa cac cag tgt cta aaa tgg cta gat tct tgg gga	869
Ala Ser Ile Asp Glu His Gln Cys Leu Lys Trp Leu Asp Ser Trp Gly	
265 270 275	
gca aac tct gta ctc ttt gta tgt ctc ggg agc cta tcg cgc ctt cca	917
Ala Asn Ser Val Leu Phe Val Cys Leu Gly Ser Leu Ser Arg Leu Pro	
280 285 290	
acg cca caa atg ata gag ctg gga ctt ggc tta gaa tcg tcg aaa aga	965
Thr Pro Gln Met Ile Glu Leu Gly Leu Gly Leu Glu Ser Ser Lys Arg	
295 300 305 310	
ccc ttt att tgg gtt gtt aga cac aag tca gat gaa ttt aaa agt tgg	1013
Pro Phe Ile Trp Val Val Arg His Lys Ser Asp Glu Phe Lys Ser Trp	
315 320 325	
cta gtt gaa gaa aat ttt gag gaa aga gtt aaa gga caa gga ctt tta	1061
Leu Val Glu Glu Asn Phe Glu Glu Arg Val Lys Gly Gln Gly Leu Leu	
330 335 340	
atc cat ggt tgg gca cca caa gta cta ata tta tct cac act tca att	1109
Ile His Gly Trp Ala Pro Gln Val Leu Ile Leu Ser His Thr Ser Ile	
345 350 355	
gga gga ttc ttg act cat tgt gga tgg aat tcg agt gtc gaa gga ata	1157
Gly Gly Phe Leu Thr His Cys Gly Trp Asn Ser Ser Val Glu Gly Ile	
360 365 370	

tct gca ggc gtt cca atg atc act tgg cca atg ttt gct gaa caa ttc 1205  
 Ser Ala Gly Val Pro Met Ile Thr Trp Pro Met Phe Ala Glu Gln Phe  
 375 380 385 390  
 tgt aat gaa agg cta ata gtg aat gta ctg aag aca gga gta aag gct 1253  
 Cys Asn Glu Arg Leu Ile Val Asn Val Leu Lys Thr Gly Val Lys Ala  
 395 400 405  
 gga att gag aat cct gtt atg ttt gga gag gaa gaa aaa gtt gga gca 1301  
 Gly Ile Glu Asn Pro Val Met Phe Gly Glu Glu Glu Lys Val Gly Ala  
 410 415 420  
 caa gtg agc aaa gat gat att aag atg gtt att gaa aga gtc atg ggc 1349  
 Gln Val Ser Lys Asp Asp Ile Lys Met Val Ile Glu Arg Val Met Gly  
 425 430 435  
 gaa gaa gag gaa gct gaa atg aga aga aaa aga gca aaa gag tta gga 1397  
 Glu Glu Glu Glu Ala Glu Met Arg Arg Lys Arg Ala Lys Glu Leu Gly  
 440 445 450  
 gaa aag gca aag agg gct atg gag gaa ggg ggt tcc tca cac ttc aac 1445  
 Glu Lys Ala Lys Arg Ala Met Glu Glu Gly Gly Ser Ser His Phe Asn  
 455 460 465 470  
 ttg aca cag ttg att caa gat gtc act gag caa gca aat att tta aaa 1493  
 Leu Thr Gln Leu Ile Gln Asp Val Thr Glu Gln Ala Asn Ile Leu Lys  
 475 480 485  
 tcc atc taggattata aagtcgattc caagttcctt ttacgatcaa tttctaacca 1549  
 Ser Ile  
 tctactagag atggtaacaa tccaaactgc gccttttttg cacaataatt attgttttat 1609  
 gttcagctag cacaaaaagt ttactattag tagaaatatt tcagctggaa ctgccgaact 1669  
 gctatgtaca ctgatggaac aatgtatgtc atgctattca aattaactct gagctgaaaa 1729  
 tatcatatag gagctgattt t 1750

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 488

&lt;212&gt; PRT

<213> *Petunia hybrida*

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Amino acid sequence of a protein having glycosyl transferase to aurone

&lt;400&gt; 8

Met Ala Ile Pro Thr Val Gln Pro His Phe Val Leu Leu Pro Phe Met

1 5 10 15

Ala Gln Gly His Thr Asn Pro Met Ile Asp Ile Ala Arg Leu Leu Ala

20 25 30

Gln Arg Gly Val Ile Ile Thr Ile Leu Thr Thr His Phe Asn Ala Thr

35 40 45

Arg Phe Lys Thr Val Val Asp Arg Ala Val Val Ala Ala Leu Lys Ile

50 55 60

Gln Val Val His Leu Tyr Phe Pro Ser Leu Glu Ala Gly Leu Pro Glu

65 70 75 80

Gly Cys Glu Ala Phe Asp Met Leu Pro Ser Met Asp Phe Ala Met Lys

85 90 95

Phe Phe Asp Ala Thr Ser Arg Leu Gln Pro Gln Val Glu Glu Met Leu

100 105 110

His Glu Leu Gln Pro Ser Pro Ser Cys Ile Ile Ser Asp Met Cys Phe

115 120 125

Pro Trp Thr Thr Asn Val Ala Gln Lys Phe Asn Ile Pro Arg Leu Val

130 135 140

Phe His Gly Met Cys Cys Phe Ser Leu Leu Cys Leu His Asn Leu Arg  
 145                      150                      155                      160  
 Asp Trp Lys Glu Leu Glu Ser Asp Ile Glu Tyr Phe Gln Val Pro Gly  
 —                      165                      170                      175  
 Leu His Asp Lys Ile Glu Leu Asn Lys Ala Gln Leu Ser Asn Ile Val  
                     180                      185                      190  
 Lys Pro Arg Gly Pro Asp Trp Asn Glu Phe Ala Asp Gln Leu Lys Lys  
                     195                      200                      205  
 Ala Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Ile Val Ala Asn Ser Phe Glu Glu Leu  
                     210                      215                      220  
 Glu Pro Glu Tyr Val Lys Gly Leu Glu Lys Ala Lys Gly Leu Lys Ile  
 225                      230                      235                      240  
 Trp Pro Ile Gly Pro Val Ser Leu Cys Asn Lys Glu Lys Gln Asp Lys  
                     245                      250                      255  
 Ala Glu Arg Gly Asn Lys Ala Ser Ile Asp Glu His Gln Cys Leu Lys  
                     260                      265                      270  
 Trp Leu Asp Ser Trp Gly Ala Asn Ser Val Leu Phe Val Cys Leu Gly  
                     275                      280                      285  
 Ser Leu Ser Arg Leu Pro Thr Pro Gln Met Ile Glu Leu Gly Leu Gly  
                     290                      295                      300  
 Leu Glu Ser Ser Lys Arg Pro Phe Ile Trp Val Val Arg His Lys Ser  
 305                      310                      315                      320  
 Asp Glu Phe Lys Ser Trp Leu Val Glu Glu Asn Phe Glu Glu Arg Val  
                     325                      330                      335  
 Lys Gly Gln Gly Leu Leu Ile His Gly Trp Ala Pro Gln Val Leu Ile  
                     340                      345                      350



Leu Ser His Thr Ser Ile Gly Gly Phe Leu Thr His Cys Gly Trp Asn

355 360 365

Ser Ser Val Glu Gly Ile Ser Ala Gly Val Pro Met Ile Thr Trp Pro

370 375 380

Met Phe Ala Glu Gln Phe Cys Asn Glu Arg Leu Ile Val Asn Val Leu

385 390 395 400

Lys Thr Gly Val Lys Ala Gly Ile Glu Asn Pro Val Met Phe Gly Glu

405 410 415

Glu Glu Lys Val Gly Ala Gln Val Ser Lys Asp Asp Ile Lys Met Val

420 425 430

Ile Glu Arg Val Met Gly Glu Glu Glu Glu Ala Glu Met Arg Arg Lys

435 440 445

Arg Ala Lys Glu Leu Gly Glu Lys Ala Lys Arg Ala Met Glu Glu Gly

450 455 460

Gly Ser Ser His Phe Asn Leu Thr Gln Leu Ile Gln Asp Val Thr Glu

465 470 475 480

Gln Ala Asn Ile Leu Lys Ser Ile

485

<210> 9

<211> 1669

<212> DNA

<213> Petunia hybrida

<220>

<223> Nucleotide sequence coding for a protein having glycosyl transferase to aurone

<400> 9

atctctctct ctctctccig aaaagaaacc cacaacgggt ttacttatcc tttgttttc 60

tgctaagtac tactactagt acacatcttt ctttctatca aacactttcc aaa atg 116  
 Met  
 1  
 ggt cag ctc cat ttt ttc ttc ttt ccc atg atg gct cat ggc cac atg 164  
 Gly Gln Leu His Phe Phe Phe Phe Pro Met Met Ala His Gly His Met  
 5 10 15  
 att cct aca cta gac atg gct aag ctt ttc gct tca cgt ggt gtt aag 212  
 Ile Pro Thr Leu Asp Met Ala Lys Leu Phe Ala Ser Arg Gly Val Lys  
 20 25 30  
 gcc acc ata atc act act cct ctc aat gaa tca gtt ttc tcc aaa gct 260  
 Ala Thr Ile Ile Thr Thr Pro Leu Asn Glu Ser Val Phe Ser Lys Ala  
 35 40 45  
 att gaa aga aac aag cat gaa att gac atc cgt ttg atc aaa ttc caa 308  
 Ile Glu Arg Asn Lys His Glu Ile Asp Ile Arg Leu Ile Lys Phe Gln  
 50 55 60 65  
 gct gtt gaa aat ggc ttg cct gaa ggt tgt gag cgt att gat ctt atc 356  
 Ala Val Glu Asn Gly Leu Pro Glu Gly Cys Glu Arg Ile Asp Leu Ile  
 70 75 80  
 cct tct gat gac aag ctt tcc aat ttt ttg aaa gct gca gct atg atg 404  
 Pro Ser Asp Asp Lys Leu Ser Asn Phe Leu Lys Ala Ala Ala Met Met  
 85 90 95  
 caa gaa cca ctt gag cag ctt att gaa gaa tgt cat ccc aat tgt ctt 452  
 Gln Glu Pro Leu Glu Gln Leu Ile Glu Glu Cys His Pro Asn Cys Leu  
 100 105 110  
 gtt tct gat atg ttc ctt cct tgg act act gat act gca gcc aag ttt 500  
 Val Ser Asp Met Phe Leu Pro Trp Thr Thr Asp Thr Ala Ala Lys Phe  
 115 120 125

aac att cca aga ata gtt ttc cat ggt acg agt ttc ttt gca ctt tgt	548
Asn Ile Pro Arg Ile Val Phe His Gly Thr Ser Phe Phe Ala Leu Cys	
130                                      135                                      140                                      145	
gta gag aat agt aac agg act aat aag cca ttc aag aac gtc tct tct	596
Val Glu Asn Ser Asn Arg Thr Asn Lys Pro Phe Lys Asn Val Ser Ser	
150                                      155                                      160	
gat tct gaa act ttt gtt gta cca aat ttg cct cac gaa atc agg cta	644
Asp Ser Glu Thr Phe Val Val Pro Asn Leu Pro His Glu Ile Arg Leu	
165                                      170                                      175	
act aga aca caa ttg tct ccg ttt gag caa tca ttg gaa gag aca cca	692
Thr Arg Thr Gln Leu Ser Pro Phe Glu Gln Ser Leu Glu Glu Thr Pro	
180                                      185                                      190	
atg tcc cga atg ata aaa gca gtt agg gaa tcg gac gcg aag agt tat	740
Met Ser Arg Met Ile Lys Ala Val Arg Glu Ser Asp Ala Lys Ser Tyr	
195                                      200                                      205	
gga gtt atc ttc aac agc ttc tat gag ctt gaa tca gat tat gtt gaa	788
Gly Val Ile Phe Asn Ser Phe Tyr Glu Leu Glu Ser Asp Tyr Val Glu	
210                                      215                                      220                                      225	
cat tat acc aag gtt ctt ggt aga aag tct tgg gct att ggc ccg ctt	836
His Tyr Thr Lys Val Leu Gly Arg Lys Ser Trp Ala Ile Gly Pro Leu	
230                                      235                                      240	
tct ttg tgc aat agg gac att gaa gat aaa gct gaa aga ggg aag att	884
Ser Leu Cys Asn Arg Asp Ile Glu Asp Lys Ala Glu Arg Gly Lys Ile	
245                                      250                                      255	
tcc tct att gat aaa cat gag tgt ttg aat tgg ctt gat tca aag aaa	932
Ser Ser Ile Asp Lys His Glu Cys Leu Asn Trp Leu Asp Ser Lys Lys	
260                                      265                                      270	

cca agt tcc att gtt tat gtt tgc ttc ggg agc gta gca gat ttc act 980  
Pro Ser Ser Ile Val Tyr Val Cys Phe Gly Ser Val Ala Asp Phe Thr  
275 280 285

gca gca caa atg cgt gaa ctt gca ttg gga att gaa gca tct gga caa 1028  
Ala Ala Gln Met Arg Glu Leu Ala Leu Gly Ile Glu Ala Ser Gly Gln  
290 295 300 305

gaa ttc att tgg gct gtt aga aga ggc aaa gag gaa caa gac aat gaa 1076  
Glu Phe Ile Trp Ala Val Arg Arg Gly Lys Glu Glu Gln Asp Asn Glu  
310 315 320

gag tgg ttg cct gaa gga ttc gag gaa aga acg aaa gaa aaa ggt cta 1124  
Glu Trp Leu Pro Glu Gly Phe Glu Glu Arg Thr Lys Glu Lys Gly Leu  
325 330 335

att att aga gga tgg gcg ccc caa gtg cta att ctt gat cac caa gct 1172  
Ile Ile Arg Gly Trp Ala Pro Gln Val Leu Ile Leu Asp His Gln Ala  
340 345 350

gtg gga gct ttt gtc act cat tgt ggt tgg aat tca acg ctt gaa gga 1220  
Val Gly Ala Phe Val Thr His Cys Gly Trp Asn Ser Thr Leu Glu Gly  
355 360 365

gta tca gca ggg gtg cct atg gtg acc tgg cct gtg ttt gca gag caa 1268  
Val Ser Ala Gly Val Pro Met Val Thr Trp Pro Val Phe Ala Glu Gln  
370 375 380 385

ttt ttc aat gaa aag ttg gtg act gag gtt ttg aga act ggg gct ggt 1316  
Phe Phe Asn Glu Lys Leu Val Thr Glu Val Leu Arg Thr Gly Ala Gly  
390 395 400

gtt ggt tca atg caa tgg aaa aga tca gct agc gag gga gta aaa agg 1364  
Val Gly Ser Met Gln Trp Lys Arg Ser Ala Ser Glu Gly Val Lys Arg  
405 410 415

gaa gca ata gct aag gca ata aag aga gtc atg gtg agt gaa gaa gca 1412

Glu Ala Ile Ala Lys Ala Ile Lys Arg Val Met Val Ser Glu Glu Ala

420

425

430

gag gga ttc aga aac cga gct aaa gcc tac aaa gag atg gca aaa caa 1460

Glu Gly Phe Arg Asn Arg Ala Lys Ala Tyr Lys Glu Met Ala Lys Gln

435

440

445

gct att gaa gaa gga gga tct tct tac tct gga ttg act act ttg cta 1508

Ala Ile Glu Glu Gly Gly Ser Ser Tyr Ser Gly Leu Thr Thr Leu Leu

450

455

460

465

caa gat ata agt aca tat agt tcc aaa agt cat taactgcaca actaaaaaaaa 1561

Gln Asp Ile Ser Thr Tyr Ser Ser Lys Ser His

470

475

tgtagtgttg ttctatacaa tttttatgct tttttatgcg tgtactaatt taaacatgga 1621

tttagtgaca gcactttttg ttacttctta taatgacatt tcggatgg 1669

<210> 10

<211> 476

<212> PRT

<213> Petunia hybrida

<220>

<223> Amino acid sequence of a protein having glycosyl transferase to aurone

<400> 10

Met Gly Gln Leu His Phe Phe Phe Phe Pro Met Met Ala His Gly His

1

5

10

15

Met Ile Pro Thr Leu Asp Met Ala Lys Leu Phe Ala Ser Arg Gly Val

20

25

30

Lys Ala Thr Ile Ile Thr Thr Pro Leu Asn Glu Ser Val Phe Ser Lys  
                   35                                  40                                  45  
 Ala Ile Glu Arg Asn Lys His Glu Ile Asp Ile Arg Leu Ile Lys Phe  
 —  50                                  55                                  60  
 Gln Ala Val Glu Asn Gly Leu Pro Glu Gly Cys Glu Arg Ile Asp Leu  
   65                                  70                                  75                                  80  
 Ile Pro Ser Asp Asp Lys Leu Ser Asn Phe Leu Lys Ala Ala Ala Met  
                                   85                                  90                                  95  
 Met Gln Glu Pro Leu Glu Gln Leu Ile Glu Glu Cys His Pro Asn Cys  
                   100                                  105                                  110  
 Leu Val Ser Asp Met Phe Leu Pro Trp Thr Thr Asp Thr Ala Ala Lys  
                   115                                  120                                  125  
 Phe Asn Ile Pro Arg Ile Val Phe His Gly Thr Ser Phe Phe Ala Leu  
                   130                                  135                                  140  
 Cys Val Glu Asn Ser Asn Arg Thr Asn Lys Pro Phe Lys Asn Val Ser  
   145                                  150                                  155                                  160  
 Ser Asp Ser Glu Thr Phe Val Val Pro Asn Leu Pro His Glu Ile Arg  
                   165                                  170                                  175  
 Leu Thr Arg Thr Gln Leu Ser Pro Phe Glu Gln Ser Leu Glu Glu Thr  
                   180                                  185                                  190  
 Pro Met Ser Arg Met Ile Lys Ala Val Arg Glu Ser Asp Ala Lys Ser  
                   195                                  200                                  205  
 Tyr Gly Val Ile Phe Asn Ser Phe Tyr Glu Leu Glu Ser Asp Tyr Val  
                   210                                  215                                  220  
 Glu His Tyr Thr Lys Val Leu Gly Arg Lys Ser Trp Ala Ile Gly Pro  
   225                                  230                                  235                                  240

Leu Ser Leu Cys Asn Arg Asp Ile Glu Asp Lys Ala Glu Arg Gly Lys  
245 250 255

Ile Ser Ser Ile Asp Lys His Glu Cys Leu Asn Trp Leu Asp Ser Lys  
260 265 270

Lys Pro Ser Ser Ile Val Tyr Val Cys Phe Gly Ser Val Ala Asp Phe  
275 280 285

Thr Ala Ala Gln Met Arg Glu Leu Ala Leu Gly Ile Glu Ala Ser Gly  
290 295 300

Gln Glu Phe Ile Trp Ala Val Arg Arg Gly Lys Glu Glu Gln Asp Asn  
305 310 315 320

Glu Glu Trp Leu Pro Glu Gly Phe Glu Glu Arg Thr Lys Glu Lys Gly  
325 330 335

Leu Ile Ile Arg Gly Trp Ala Pro Gln Val Leu Ile Leu Asp His Gln  
340 345 350

Ala Val Gly Ala Phe Val Thr His Cys Gly Trp Asn Ser Thr Leu Glu  
355 360 365

Gly Val Ser Ala Gly Val Pro Met Val Thr Trp Pro Val Phe Ala Glu  
370 375 380

Gln Phe Phe Asn Glu Lys Leu Val Thr Glu Val Leu Arg Thr Gly Ala  
385 390 395 400

Gly Val Gly Ser Met Gln Trp Lys Arg Ser Ala Ser Glu Gly Val Lys  
405 410 415

Arg Glu Ala Ile Ala Lys Ala Ile Lys Arg Val Met Val Ser Glu Glu  
420 425 430

Ala Glu Gly Phe Arg Asn Arg Ala Lys Ala Tyr Lys Glu Met Ala Lys  
435 440 445

Gln Ala Ile Glu Glu Gly Gly Ser Ser Tyr Ser Gly Leu Thr Thr Leu

450

455

460

Leu Gln Asp Ile Ser Thr Tyr Ser Ser Lys Ser His

465

470

475

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 11.

ataactacat atggctattc ccaca

25

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 12

gaacaggatc ctaaaaggac ct

22

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 13



ataactacat atgggtcagc tcca

24

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

&lt;400&gt; 14

ctcgtacat ggaaaactat tct

23

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00876

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N 15/54, C12N 1/21, C12N 9/10, A01H 5/00, C12P 19/18  
 //(C12N 1/21, C12R 1:19)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N 15/54, C12N 1/21, C12N 9/10, A01H 5/00, C12P 19/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI/L (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN), JOIS, GenBank/EMBL/GeneSeq, Swiss  
 Prot/PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 99/05287, A1 (SUNTORY LIMITED), 04 February, 1999 (04.02.99) & EP, 967283, A1 & AU, 9882432, A	1-12
A	HALBWIRTH, H. et al. "Enzymatic glucosylation of 4-deoxyaurones and 6'-deoxychalcones with enzyme extracts of <i>Coreopsis grandiflora</i> , Nutt. I.", Plant Sci. (1997. Jan) Vol. 122, No. 2, p. 125-131	1-12
A	HORVATH, D. M. et al. "Identification of an immediate-early salicylic acid-inducible tobacco gene and characterization of induction by other compounds.", Plant Mol. Biol. (August 1996) Vol. 31, No. 5, p. 1061-1072	1-12
P, A	Database GenBank Accession No. AB031274, August 18, 1999, Hirotani, M. et al., "Scutellaria baicalensis ufgt mRNA for UDP-glucose: flavonoid 7-O-glucosyltransferase, complete cds."	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
08 March, 2000 (08.03.00)

Date of mailing of the international search report  
21. 03. 00

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/54, C12N 1/21, C12N 9/10, A01H 5/00, C12P 19/18  
77(C12N 1/21, C12R 1:19)

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/54, C12N 1/21, C12N 9/10, A01H 5/00, C12P 19/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI/L(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), MEDLINE(STN), JOIS, GenBank/EMBL/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 99/05287, A1 (SUNTORY LIMITED) 04.2月.1999(04.02.99) & EP, 967283, A1 & AU, 9882432, A	1-12
A	HALBWIRTH, H. et al. "Enzymatic glucosylation of 4-deoxyaurone s and 6'-deoxychalcones with enzyme extracts of <i>Coreopsis grandiflora</i> , Nutt. I.", Plant Sci. (1997. Jan) Vol. 122, No. 2, p. 125-131	1-12
A	HORVATH, D. M. et al. "Identification of an immediate-early salicylic acid-inducible tobacco gene and characterization of induction by other compounds.", Plant Mol. Biol. (1996. Aug)	1-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.03.00

国際調査報告の発送日

21.03.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二



4N

2937

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, A	Vol. 31, No. 5, p. 1061-1072  Database GenBank Accession No. AB031274, August 18, 1999, Hirotani, M. et al., "Scutellaria baicalensis ufgt mRNA for UDP-glucose:flavonoid 7-O-glucosyltransferase, complete cds."	1-12